

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005年9月15日 (15.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/085447 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/56, (72) 発明者; および  
1/15, 1/19, 1/21, 5/10, 9/42, C12P 19/14 (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 中村 博文 (NAKA-MURA, Hirofumi) [JP/JP]; 〒3500289 埼玉県坂戸市千代田5丁目3番1号 明治製菓株式会社内 Saitama (JP).  
(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/003787  
(22) 国際出願日: 2005年3月4日 (04.03.2005)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ:  
特願2004-060426 2004年3月4日 (04.03.2004) JP  
(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 明治製菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒1048002 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 吉武 賢次, 外 (YOSHITAKE, Kenji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo (JP).  
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

/ 続葉有 /

(54) Title:  $\beta$ -FRUCTOFURANOSIDASE MUTANT

(54) 発明の名称:  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体

SYHLDTTAPP PTNLSTLPPNN TLFHVWRPRA HILPAEGQIG DPCAHYTDPS TGLFHVGFH  
TYPSIDYNSA PPNLSTLANN SLFETWRPRA HVLPQNQIG DPCMHYTDPF TGIFHVGVLY  
FHTPIDYNSA PPNLSTLANA SLFKTWRPRA HLLPPSGNIG DPCGHYTDPK TGLFHVGVLY  
  
60  
DGGIAGATT ANLATYTDTG DNGSFLIQPG GKNDPVAVFD GAVIPVGVNN TPTLLYTSVS  
NGNGASATT EDLVITYQDLN PDGAQMILPG GVNDPLAVFD GAVIPSGIDG KPTMMYTSVS  
SG-ISGATT DDLVTYKDLN PDGAPSIVAG GKNDPLSVFD GSVIPSGIDG MPTLLYTSVS  
  
62  
DPIIHWSIIPY TRGSETQSLA VARDGRRFD KLDQGPVIAD HPFAVDTIAF RDPIFVFRSAK  
YMPISWATAY TRGSETHSLA VSSDGKGNFT KLVOGPVIIPS PPFCANVTSW RDPLFQNPQ  
YUPIIHWSIIPY TRGSETQSLA VSYDGHHNFT KLNQGPVIPT PPFAVNTIAF RDPYVFQSPI  
  
120  
LDVLILSDEE VARNETAVQQ AVDGWTEKNA PWYVAVSGGV HGVPQAQFLY RQNGGNASEF  
FDSLLE-----SENG TWYTVISGGI HGDPGSAFLY RQHD---PDF  
LDKSVN-----STQG TWYVAISGGV HGVPQCFLY RQND---ADF  
  
140  
QWEYLGEWW QEAINTSSWGD EGTWAGRWF NFETGNVFL TEEGHDPQTG EVFVTLGTEG  
QWEYLGPPW NEEGNSTWGS -GDWAGRWFY NEEVINVGL DDDGYNP-DG EIFATVGTEW  
QWEYLGQWW KEPLNTTWGK -GDWAGGWGF NFEVGNVFSL NAEGYSE-DG EIFITLGAE  
  
160  
321  
SGLPIVPQVS SIEMLNAAVG EVGVGSEQEG AKVEFSPSMA GFLDWGFSAY AAAGKVLPS  
SFDPIKPQAS DNEMMLWAAG NMTL---ED GDIKFTPSMA GYLLWGGLSAY AAAGKELPS  
SGLPIVPQVS SIEMLNWTG NVTN----D GSVTFKPTMA GVLDWGVSAV AAAGKILPS  
  
221  
340  
300  
313  
360

(57) Abstract: It is intended to provide a  $\beta$ -fructofuranosidase mutant the reaction properties of which have been improved so as to suit for the production of a fructooligosaccharide. Namely, a  $\beta$ -fructofuranosidase mutant comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 having a mutation in a specific amino acid residue or a homolog thereof.

(57) 要約: 本発明は、フラクトオリゴ糖の製造に適するように反応特性が改善された $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体の提供を目的とする。本発明によれ

/ 続葉有 /

WO 2005/085447 A1



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,

IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 國際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

### $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体

#### 発明の分野

[0001] 本発明は、ショ糖から特定のフラクトオリゴ糖を選択的かつ効率的に生成する $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体に関し、より詳細には、1-ケストースを効率的に生産する $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体およびニストースを効率的に生産する $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体に関する。

#### 背景技術

[0002] 一般にフラクトオリゴ糖は、ショ糖のフルクトースに1から3分子のフルクトースがC1とC2の位置で $\beta$ 結合しているオリゴ糖であり、難消化性の糖質で、腸内のビフィズス菌増殖促進作用、コレステロールなどの脂質代謝改善作用、難う蝕性、ミネラル吸収促進作用などの優れた生理機能を有することが見出されている。フラクトオリゴ糖は、天然には広く植物に分布しており、例えばタマネギ、アスパラガス、キクイモなどに含まれていることが知られているが、最近では、微生物由来の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼの転移反応を利用してショ糖から大量に製造する技術が確立され、工業的に生産されている。現在フラクトオリゴ糖の工業的生産に利用されている $\beta$ -フルクトフラノシダーゼは、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)由来の菌体内 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼを利用している。

[0003] 当該 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子は、WO97/34004号公報に開示されている。しかし、当該 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼは、1-ケストース、ニストース、1-フルクトシリニストースの混合物としてフラクトオリゴ糖を生成するため、フラクトオリゴ糖はオリゴ糖混合物のシロップあるいは粉末として製造、提供されている。単一成分として、1-ケストースあるいはニストースを選択的かつ効率的に生産する $\beta$ -フルクトフラノシダーゼが得られれば、次のような有用性が存在する。すなわち、1-ケストースあるいはニストースを高純度に精製し、結晶化させることによって、フラクトオリゴ糖の生理機能を保持したまま、物性および加工特性上優れた特性を有する单一成分の結晶フラクトオリゴ糖を製造することが可能となる。

[0004] 一方、ショ糖を原料とした結晶1-ケストースの工業的製造法は、例えば、WO97/21718号公報に開示されている。すなわち、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼをショ糖に作用させて1-ケストースに生成させ、クロマト分離法により1-ケストースを純度80%以上に生成した後、これを結晶化原液として純度95%以上の結晶1-ケストースを得る方法である。この方法に用いられる酵素の特性として、ショ糖から1-ケストースへの変換率が高いこと、ニストースの生成量が低いことが工業的製造法において求められている。また同様にニストースを单一成分として製造する場合には、ニストースへの変換率が高いこと、1-フルクトシリニストースの生成量が低いことが工業的製造法において求められている。

## 発明の概要

[0005] 本発明は、フラクトオリゴ糖の単一成分、例えば1-ケストースあるいはニストースの製造に適するように反応特性が改善された $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体およびその遺伝子の提供をその目的とする。

[0006] 本発明者らは、配列番号2のアミノ酸配列中の特定位置のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体が、1-ケストースあるいはニストースの製造に適する反応特性を有していることを見出した。

[0007] すなわち本発明の第一の態様によれば、(a) 62番、122番、128番、165番、221番、395番、および550番のアミノ酸残基において少なくとも1つの変異を有する、配列番号2に記載のアミノ酸配列; または(b) 配列番号2の62番、122番、128番、165番、221番、395番、および550番のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基において少なくとも1つの変異を有する、配列番号2に記載のアミノ酸配列の相同体からなる、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体が提供される。

[0008] 本発明の第二の態様によれば、(c) 40番、379番、および381番のアミノ酸残基において少なくとも1つの変異を有する、配列番号2に記載のアミノ酸配列; または(d) 配列番号2の40番、379番、および381番のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基において少なくとも1つの変異を有する、配列番号2に記載のアミノ酸配列の相同体からなる、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体が提供される。

[0009] 本発明による $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体を用いれば、フラクトオリゴ糖を製造

する際の酵素反応液の糖組成を改善することが可能となり、フラクトオリゴ糖の单一成分の効率的な製造が可能となる。すなわち、本発明による $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体によれば、従来と比較して簡便に、かつ安価にフラクトオリゴ糖の単一成分の工業的製造が可能となる点で有利である。

### 図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体を整列させた例を示した図である。上段はA. niger由来の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列(配列番号2)、中段はS. brevicaulis由来の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列(配列番号6)、下段はP. roqueforiti由来の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列(配列番号4)を表す。図中の数字はA. nigerのN末端を1番目としたときのアミノ酸番号を表す。枠で示した部分は、特定変異部分を表す。

[図2]図2は、図1のアミノ酸配列の続きである。

### 発明の具体的説明

[0011]  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体およびその遺伝子

本発明による第一および第二の態様による変異体は、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体の特定のアミノ酸残基の少なくとも1つに変異が導入されてなるものである。

[0012] 変異が導入されるアミノ酸残基の位置は、配列番号2のアミノ酸配列のアミノ酸残基番号と対応する。

[0013] 本発明において「変異」とは、置換、欠失、および挿入を意味する。

[0014] 「置換」とは、特定のアミノ酸残基が取り除かれ、かつ他のアミノ酸残基が同じ位置に挿入されていることをいう。

[0015] 「欠失」とは、特定のアミノ酸残基が取り除かれていることを意味する。

[0016] 「挿入」とは、特定のアミノ酸残基の前にあるいは後ろに、1個または複数個のアミノ酸残基が挿入されていることをいい、具体的には、特定のアミノ酸残基の $\alpha$ -カルボキシル基あるいは $\alpha$ -アミノ基に、1個または複数個、好ましくは、1個ないし数個、のアミノ酸残基が結合することをいう。

[0017] 配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体に導入される特定変異の数は

特に限定されないが、1個ないし数個、1個ないし3個、あるいは1または2個であることができる。

- [0018] 本発明の第一および第二の態様による変異体において、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体に導入される変異は、好ましくは、置換である。
- [0019] 本発明の第一の態様による変異体において、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体の62番、122番、128番、165番、221番、395番、および550番のアミノ酸残基に導入される置換は、好ましくは、下記の通りである。
- [0020] 62番のアミノ酸残基の、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択される酸性アミノ酸、特にグルタミン酸、への置換。
- [0021] 122番のアミノ酸残基の、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸、特にメチオニン、への置換。
- [0022] 128番のアミノ酸残基の、アスパラギンおよびグルタミンからなる群から選択されるアミノ酸、特にアスパラギン、への置換。
- [0023] 165番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸、特にフェニルアラニン、への置換。
- [0024] 221番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸、特にチロシン、への置換。
- [0025] 395番のアミノ酸残基の、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸、特にロイシン、への置換。
- [0026] 550番のアミノ酸残基の、セリンおよびスレオニンからなる群から選択されるヒドロキシアミノ酸、特にセリン、への置換。
- [0027] 本発明の第一の態様による変異体においては、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体の、170番、300番、313番、および386番の少なくとも1つのアミノ酸残基において、更に変異、好ましくは、置換、を有していてもよい。これらの変異を有する $\beta$ -フルクトフラノシダーゼは、1-kestostoseを選択的にかつ効率的に生産できる点で有利である(例えば、WO99/13059号公報参照)。
- [0028] 本発明の第一の態様による変異体において、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体の170番、300番、313番、および386番に導入することができる置

換は、好ましくは、下記の通りである。

- [0029] 170番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸、特にトリプトファン、への置換。
- [0030] 300番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンおよびバリンからなる群から選択されるアミノ酸、特にバリン、への置換。
- [0031] 313番のアミノ酸残基の、リジン、アルギニン、およびヒスチジンからなる群から選択される塩基性アミノ酸、特にリジンまたはアルギニン、への置換。
- [0032] 386番のアミノ酸残基の、リジン、アルギニン、およびヒスチジンからなる群から選択される塩基性アミノ酸、特にリジン、への置換。
- [0033] 本発明の第一の態様による変異体において、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体に導入することができる好ましい多重変異としては、165番のアミノ酸残基と、300番のアミノ酸残基と、313番のアミノ酸残基の三重変異、より好ましくは三重置換、が挙げられ、特に好ましくは、165番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンから選択される芳香族アミノ酸への置換(最も好ましくはフェニルアラニンへの置換)と、300番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンおよびバリンから選択されるアミノ酸への置換(最も好ましくはバリンへの置換)と、および313番のアミノ酸残基の、リジン、アルギニン、およびヒスチジンから選択される塩基性アミノ酸への置換(最も好ましくはリジンまたはアルギニンへの置換)とからなる三重置換が挙げられる。
- [0034] 本発明の第二の態様による変異体において、配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体の40番、379番、および381番のアミノ酸残基に導入される置換は、好ましくは、下記の通りである。
- [0035] 40番のアミノ酸残基の、アスパラギン酸およびグルタミン酸から選択される酸性アミノ酸、特にアスパラギン酸、への置換。
- [0036] 379番のアミノ酸残基の、システインへの置換。
- [0037] 381番のアミノ酸残基の、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、およびバリンから選択されるアミノ酸、特にメチオニン、への置換。
- [0038] 本発明による第一および第二の態様による変異体において、「相同体」とは、1個ま

たは複数個の変異を有する配列番号2に記載のアミノ酸配列であって、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ活性を有するもの、を意味する。変異の数は、1個ないし数個、あるいは1、2、3、または4個であることができる。

- [0039] 本発明において、相同体が $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ活性を有するか否かは、例えば、そのアミノ酸配列からなるタンパク質を基質に作用させ、反応産物を検出することにより評価することができ、例えば、実施例2に記載の方法に従って評価することができる。
- [0040] 相同体における本発明による特定変異の位置は、配列番号2のアミノ酸配列と当該相同体とを整列し、相同体に対応する配列番号2のアミノ酸残基番号を基に決定する。例えば、相同体における「62番のアミノ酸残基の変異」とは、その相同体の62番のアミノ酸残基の変異ではなく、配列番号2のアミノ酸配列の62番のアミノ酸残基に対応する相同体のアミノ酸残基の変異を意味する。配列番号2のアミノ酸配列とその相同体を整列させた例は図1および図2に示されている。
- [0041] 配列番号2のアミノ酸配列と当該相同体との整列は、配列同一性を調べるための分析用ソフトウェアを用いて行うことができる。このようなソフトウェアは周知であり、当業者であれば適宜選択して使用することは言うまでもない。例えば、BLAST法(Basic local alignment search tool; Altschul, S.F. et al., J.Mol.Biol., 215, 403–410(1990))を使用して配列番号2のアミノ酸配列と当該相同体とを整列させて、対応するアミノ酸残基を決定することができる。
- [0042] 相同体の例としては、1個または複数個(例えば、1個ないし数個あるいは1、2、3、または4個)の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ活性に影響を与えない変異を有する配列番号2に記載のアミノ酸配列が挙げられる。
- [0043] ここで「活性に影響を与えない変異」の例としては、保存的置換が挙げられる。「保存的置換」とは、タンパク質の活性を実質的に改変しないように1若しくは複数個のアミノ酸残基を、別の化学的に類似したアミノ酸残基で置き換えることを意味する。例えば、ある疎水性残基を別の疎水性残基によって置換する場合、ある極性残基を同じ電荷を有する別の極性残基によって置換する場合などが挙げられる。このような置換を行うことができる機能的に類似のアミノ酸は、アミノ酸毎に当該技術分野において

公知である。具体例を挙げると、非極性(疎水性)アミノ酸としては、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニンなどが挙げられる。極性(中性)アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システインなどが挙げられる。陽電荷をもつ(塩基性)アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、リジンなどが挙げられる。また、負電荷をもつ(酸性)アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

- [0044] 「相同体」の例としては、また、Aspergillus属、Penicillium属およびScopulariopsis属に属する微生物から生産されるβ-フルクトフラノシダーゼが挙げられ、例えば、Aspergillus niger由来のβ-フルクトフラノシダーゼ、Penicillium roqueforti由来のβ-フルクトフラノシダーゼ、Scopulariopsis brevicaulis由来のβ-フルクトフラノシダーゼが挙げられる。Penicillium roqueforti由来のβ-フルクトフラノシダーゼとしてはWO99/13059号公報の配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質(配列番号4)が挙げられる。また、Scopulariopsis brevicaulis由来のβ-フルクトフラノシダーゼとしてはWO99/13059号公報の配列番号3のアミノ酸配列からなるタンパク質(配列番号6)が挙げられる。
- [0045] 本発明によれば、本発明によるβ-フルクトフラノシダーゼ変異体をコードする遺伝子が提供される。
- [0046] 一般に、タンパク質のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードするDNA配列は、いわゆるコドン表を参照して容易に定まる。従って、本発明による特定変異が導入された配列番号1のアミノ酸配列およびその相同体、例えば、本発明による特定変異が導入された配列番号2、4、および6のアミノ酸配列、をコードする種々のDNA配列を適宜選択することが可能である。よって、本発明による特定変異が導入されたβ-フルクトフラノシダーゼ変異体をコードするDNA配列とは、本発明による特定アミノ酸変異に対応するDNA変異を有するβ-フルクトフラノシダーゼ遺伝子のみならず、その縮重関係にあるコドンが使用されている以外は同一のDNA配列を有し、かつβ-フルクトフラノシダーゼ変異体をコードするDNA配列をも意味する。例えば、本発明による特定変異が導入された配列番号2、4、および6のアミノ酸配列をコードするDNA配列とは、後述する表3に記載の1以上の変異を有する配列番号1、3、および5

のDNA配列のみならず、その縮重関係にあるコドンが使用されている以外は同一のDNA配列を有し、かつ $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードするDNA配列をも意味する。

[0047]  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体の作製

$\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体は、組換えDNA技術、ポリペプチド合成技術などによって作製することができる。組換えDNA技術を用いる場合には、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼをコードするDNA(例えば、配列番号1、3、または5のDNA配列)を取得し、このDNAに部位特異的変異あるいはランダム変異を発生させてコードするアミノ酸を置換させた後、変異処理を施したDNAを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、形質転換細胞を培養することによって $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体を調製することができる。

[0048] 遺伝子の部位特異的変異を導入するための方法は、Gapped duplex法やKunkel法など当業者に周知の方法を用いることができる。これらの方法は、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼをコードするDNAの特異的部位に突然変異を発生させることに利用することができる。

[0049] また、ランダム変異を導入するためには、エラープローンPCR法など一般的に行われている方法が採用できる。変異処理後のDNAの塩基配列は、マキサム・ギルバートの化学修飾法やジデオキシヌクレオチド鎖終結法などにより確認することができ、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体のアミノ酸配列は、確認された塩基配列より解読することができる。

[0050]  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体の生産

$\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体は、それをコードするDNA断片を、宿主細胞内で複製可能でかつ同遺伝子を発現可能な状態で含むDNA分子、特にDNA発現ベクター、に連結してなる組換えベクターを調製し、その組換えベクターを宿主に入れて形質転換体を得て、その形質転換体を適当な培養条件下で培養することにより、調製することができる。

[0051] 本発明において利用されるベクターは、使用する宿主細胞の種類を勘案して、ウィルス、プラスミド、コスミドベクターなどから適宜選択することができる。例えば、宿主細

胞が大腸菌の場合はpUC、pBR系のプラスマド、枯草菌の場合はpUB系のプラスマド、酵母の場合はYE<sub>p</sub>、YRp、YCp系のプラスマドベクターが挙げられる。

- [0052] 本発明の好ましい態様によれば、組換えベクターとしてプラスマドを使用することができる。プラスマドは形質転換体の選択マーカーを含むのが好ましく、選択マーカーとしては薬剤耐性マーカー、栄養要求マーカーを使用することができる。その好ましい具体例としては、使用する宿主細胞が細菌の場合はアンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子などであり、酵母の場合はトリプトファン合成遺伝子(TRP1)、ウラシル合成遺伝子(URA3)、ロイシン合成遺伝子(LEU2)などがあり、カビの場合はハイグロマイシン耐性遺伝子(Hyg)、ビアラホス耐性遺伝子(Bar)、硝酸還元酵素遺伝子(niaD)などが挙げられる。
- [0053] 本発明による発現ベクターとしてのDNA分子は、変異遺伝子の発現に必要なDNA配列、例えばプロモーター、転写開始信号、リボゾーム結合部位、翻訳停止シグナル、転写終結シグナルなどの転写調節シグナル、翻訳調節シグナルなどを有しているのが好ましい。
- [0054] プロモーターとしては、挿入断片に含まれる宿主中において機能することができるプロモーターはもちろんのこと、大腸菌においてはラクトースオペロン(lac)、トリプトファンオペロン(trp)などのプロモーター、酵母ではアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子(ADH)、酸性フォスファターゼ遺伝子(PHO)、ガラクトース遺伝子(GAL)、グリセロアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(GPD)などのプロモーター、カビでは $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子(amy)、セロビオハイドロラーゼI遺伝子(CBHI)などのプロモーターを好ましく用いることができる。
- [0055] 宿主としては、宿主一ベクター系が確立されているものであればいずれも利用可能であり、好ましくは、カビ、酵母が挙げられる。宿主細胞の形質転換により得られた形質転換体は、適当な条件で培養し、得られた培養液から一般的な方法によって酵素の分取や精製を行うことにより $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体を得ることができる。また、宿主が枯草菌、酵母、カビの場合には、分泌型ベクターを使用して、菌体外に組換え $\beta$ -フルクトフラノシダーゼを分泌させることも有利である。
- [0056] 形質転換体から生産される本発明による変異体は、次のようにして得ることが出来

る。まず前記の宿主細胞を適切な条件下で培養し、得られた培養物から公知の方法、例えば遠心分離により培養上清あるいは菌体を得る。菌体の場合にはこれを適切な緩衝液中に懸濁し、凍結融解、超音波処理、磨碎などにより菌体を破碎し、遠心分離またはろ過により組換え酵素を含有する菌体抽出物を得る。

[0057] 酵素の精製は、慣用されている分離、精製法を適宜組み合わせて実施することができる。例えば、熱処理のような耐熱性の差を利用する方法、塩沈澱および溶媒沈澱のような溶解性の差を利用する方法、透析、限外ろ過、ゲルろ過およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーのような電荷の差を利用する方法、アフィニティーコロマトグラフィーのような特異的親和性を利用する方法、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーのような疎水性の差を利用する方法、更に等電点電気泳動のような等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

[0058] フラクトオリゴ糖の製造

本発明によれば、本発明による形質転換体または本発明による $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体を用いた、フラクトオリゴ糖の製造法が提供される。すなわち、本発明によるフラクトオリゴ糖の製造法は、本発明による形質転換体または本発明による $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体と、スクロースとを接触させることによって実施される。

[0059] 本発明による形質転換体または本発明による $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体と、スクロースとの接触様態およびその条件は、変異体がスクロースに作用可能な様態である限り特に限定されない。溶液中で接触させる場合の好ましい様態を示せば次の通りである。すなわち、スクロースの使用濃度は、用いる糖が溶解されうる範囲であれば、本酵素の比活性、反応温度などを考慮して適宜選択してよいが、5~80%の範囲とするのが一般的であり、好ましくは30~70%の範囲である。糖と酵素との反応における反応温度およびpH条件は、変異体の最適条件下で行うことが好ましく、例えば、30~80°C程度、pH4~10程度の条件下で行うのが一般的であり、好ましくは40~70°C、pH5~7の範囲である。

[0060] また、変異体の精製の程度も適宜選択することができ、形質転換体の培養上清あるいは菌体破碎物から粗酵素のまま用いることもでき、また、各種精製工程で得られた

精製酵素として利用してもよい。さらには各種精製手段を経て単離精製された酵素として用いてもよい。

- [0061] 更に酵素は、常法に準じて担体に固定化された状態でスクロースと接触させてもよい。
- [0062] 生成したフラクトオリゴ糖は、反応液を公知の方法に従い精製することにより得ることが出来る。例えば、加熱して酵素を失活させた後、活性炭により脱色し、さらに、イオン交換樹脂で脱塩する方法が挙げられる。
- [0063] 本発明の第一の態様の変異体をフラクトオリゴ糖の調製に用いると、1-ケストース生成量が増大し、ニストース生成量が抑制される。従って、本発明によれば1-ケストースの選択的な製造法が提供される。すなわち本発明によれば、第一の態様の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体あるいは第一の態様の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードするポリヌクレオチドを発現可能な形質転換体と、スクロースを接触させる工程を含んでなる、1-ケストースの製造法が提供される。
- [0064] 本発明の第二の態様の変異体をフラクトオリゴ糖の調製に用いると、ニストースの生成量が増大し、1-ケストース生成量が抑制される。従って、本発明によればニストースの選択的な製造法が提供される。すなわち本発明によれば、第二の態様の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体あるいは第二の態様の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードするポリヌクレオチドを発現可能な形質転換体と、スクロースを接触させる工程を含んでなる、ニストースの製造法が提供される。

### 実施例

- [0065] 本発明を下記例により詳細に説明するが、本発明がこれらの例に限定されないことは言うまでもない。

[0066] 実施例1:  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体の作製

$\beta$ -フルクトフラノシダーゼ遺伝子へのランダム変異の導入は、市販のPCR mutagenesis kit(Gene Morph, Stratagene社)を用いて以下のように行った。鑄型DNAとして、ATCC20611株(*A. niger*)由来の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ遺伝子を用いた。具体的には、WO97/34004に記載のプラズミドpAW20-Hygを使用した。PCR反応液は、鑄型DNA 1  $\mu$ l, 40mM dNTP 1  $\mu$ l, 10倍濃度の緩衝液5  $\mu$ l、プラ

イマーとして5'-GCGAATTCATGAAGCTCACCACTACCA-3' (N末) (配列番号7) および5'-GCGGATCCCGGTCAATTCTCT-3' (C末) (配列番号8) 250ng/mlを各0.5 μl、Mutazyme 1 μl、DMSO 5 μl、滅菌水36 μlを加えて50 μlとした。反応は94°C、2分間の前処理後、94°C、1分間(変性ステップ)、50°C、2分間(アニーリングステップ)、72°C、2.5分間(伸長ステップ)のインキュベーションを30サイクル行った。最後に72°C、3分間のインキュベーションを行い反応を終了させた。反応液をフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールで抽出し、その後エタノール沈殿を行った。沈殿をTE緩衝液に溶解後、アガロース電気泳動を行い、特異的に増幅された1.9 kbpのバンドを常法に従って切り出してDNA断片を回収した。WO97/34004に記載の方法で、1.9 kbpのEcoRI-BamHI断片をpY2831のEcoRI-BamHI部位に挿入したプラスミドを*S. cerevisiae* MS-161株に酢酸リチウム法で導入し、形質転換体を得た。得られた形質転換体をSD-GF培地(0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids、2% スクロース、2% casamino acids、50 μg/ml ウラシル)で30°C、3日間培養し、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体を得た。

[0067] 実施例2:  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体の反応特性の評価

実施例1で作製した $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体を用いてスクロースを基質とした酵素反応を基質濃度48%、pH7、40°Cの反応条件で行い、反応液の糖組成をHPLC分析した。野生型 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼの酵素反応液の糖組成と比較して、糖組成が変動したものを反応特性が改変された $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体とした。

[0068] 反応特性が改変された $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体の変異点を同定するため、DNA塩基配列を解析した。ファルマシア社のDNAシークエンスキットを用い、シークエンス反応を行った。反応後のサンプルは、ファルマシア社のDNAシークエンサー(ALFred)を用いて解析を行い、各DNA断片の塩基配列を得た。その後、DNA解析ソフト(DNASIS、日立ソフトウェアエンジニアリング社)にて最終的な塩基配列を得て、ランダム変異の導入された変異点を決定した。その結果、表1および表2に示したように、1-ケストースを効率的に生産する $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体、およびニストースを効率的に生産する $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体が得られて

いることが明らかとなつた。

[表1]

表1：1-ケストース生成量が増大し、ニストース生成量が抑制された $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体

	F	G	G F	G F <sub>2</sub>	G F <sub>3</sub>	G F <sub>4</sub>
野生型	0.4	22.3	20.5	45.1	11.3	0.3
G 6 2 E	0.6	22.1	21.1	46.0	10.0	0.2
L 1 2 2 M	0.7	22.1	19.7	47.9	9.6	0.0
I 1 2 8 N	0.8	20.7	26.5	45.1	6.5	0.5
V 1 6 5 F	0.6	22.0	19.8	46.8	10.8	0.0
H 2 2 1 Y	0.6	23.8	20.1	45.8	9.5	0.2
Q 3 9 5 L	0.6	22.1	21.4	46.5	9.1	0.2
T 5 5 0 S	0.9	26.3	13.1	48.4	10.4	0.9

F : フルクトース

G : グルコース

G F : スクロース

G F<sub>2</sub> : 1-ケストース

G F<sub>3</sub> : ニストース

G F<sub>4</sub> : 1-フルクトシルニストース

[表2]

表2：ニストースの生成量が増大し、1-ケストース生成量が抑制された $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体

	F	G	G F	G F <sub>2</sub>	G F <sub>3</sub>	G F <sub>4</sub>
野生型	0.4	22.3	20.5	45.1	11.3	0.3
G 4 O D	0.6	22.3	20.3	41.6	14.7	0.5
T 3 8 1 M	1.5	23.7	23.9	28.8	19.3	2.8
W 3 7 9 C	1.1	22.6	22.5	36.2	17.0	0.6

F : フルクトース

G : グルコース

G F : スクロース

G F 2 : 1-ケストース

G F 3 : ニストース

G F 4 : 1-フルクトシルニストース

[0069] 得られた変異とそれに対応するDNA配列は下記の通りであった。下線は変異したDNAを示す。

[表3]

表3：変異部分のアミノ酸残基とDNA配列

G 6 2 E      G A C      G A G      G A C  
 A s p      G l u      A s p      (配列番号 9 )

L 1 2 2 M      T T C      A T G      C C C  
 P h e      M e t      P r o      (配列番号 10 )

I 1 2 8 N      T C C      A A C      C C C  
 S e r      A s n      P r o      (配列番号 11 )

V 1 6 5 F      G C C      T T C      G A C  
 A l a      P h e      A s p      (配列番号 12 )

H 2 2 1 Y      G T G      T A C      G G C  
 V a l      T y r      G l y      (配列番号 13 )

Q 3 9 5 L      G C C      C T G      C A G  
 A l a      L e u      G l n      (配列番号 14 )

T 5 5 0 S      T T T      T C G      G A G  
 P h e      S e r      G l u      (配列番号 15 )

G 4 0 D      A T C      G A C      G A C  
 I l e      A s p      A s p      (配列番号 16 )

T 3 8 1 M      T T G      A T G      G G C  
 L e u      M e t      G l y      (配列番号 17 )

W 3 7 9 C      G T C      T G C      T T G  
 V a l      C y s      L e u      (配列番号 18 )

#### [0070] 実施例3:部位指定変異による多重置換体の調製と反応特性の評価

実施例2で得られたV165FとWO97/34004に記載のG300VとH313Kを組み

合わせた3重置換変異体を部位特異的変異導入により調製した。具体的には、実施例1および2で調製したV165Fの変異が導入された $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ遺伝子をpUC118(宝酒造)のEcoRI-BamHI部位に挿入したプラスミドを調製した。次いで、WO97/34004号公報の実施例D8と同様の方法でG300VとH313Kの変異を順次導入した。実施例2と同じ方法でDNA塩基配列を調べた結果、目的の部分の塩基配列のみが置換されていることを確認した。

[0071] 3重置換体V165F+G300V+H313Kの反応特性を実施例2の方法に従って調べた結果は表3に記載される通りであった。野生型 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼと比較すると、1-ケストースの糖組成%は約10%増大し、ニストースの生成量は7%減少した。

[表4]

表4：三重置換体の反応特性

	F	G	GF	GF <sub>2</sub>	GF <sub>3</sub>	GF <sub>4</sub>
野生型	0.4	22.3	20.5	45.1	11.3	0.3
V165F/G300V/H313K	1.7	22.5	15.8	55.7	4.3	0.0

F : フルクトース

G : グルコース

GF : スクロース

GF<sub>2</sub> : 1-ケストース

GF<sub>3</sub> : ニストース

GF<sub>4</sub> : 1-フルクトシルニストース

## 請求の範囲

- [1] 下記アミノ酸配列からなる、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体：
- (a) 62番、122番、128番、165番、221番、395番、および550番のアミノ酸残基において少なくとも1つの変異を有する、配列番号2に記載のアミノ酸配列；または
- (b) 配列番号2の62番、122番、128番、165番、221番、395番、および550番のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基において少なくとも1つの変異を有する、配列番号2に記載のアミノ酸配列の相同体。
- [2] 変異が、置換である、請求項1に記載の変異体。
- [3] 置換が、
- 62番のアミノ酸残基の、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択される酸性アミノ酸への置換、
- 122番のアミノ酸残基の、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸への置換、
- 128番のアミノ酸残基の、アスパラギンおよびグルタミンからなる群から選択されるアミノ酸への置換、
- 165番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸への置換、
- 221番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸への置換、
- 395番のアミノ酸残基の、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸への置換、および
- 550番のアミノ酸残基の、セリンおよびスレオニンからなる群から選択されるヒドロキシアミノ酸への置換
- である、請求項2に記載の変異体。
- [4] 配列番号2に記載のアミノ酸配列およびその相同体の、170番、300番、313番、および386番の少なくとも1つのアミノ酸残基において、更に変異を有する、請求項1～3のいずれか一項に記載の変異体。
- [5] 変異が置換である、請求項4に記載の変異体。

- [6] 置換が、  
170番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸への置換、  
300番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンおよびバリンからなる群から選択されるアミノ酸への置換、  
313番のアミノ酸残基の、リジン、アルギニン、およびヒスチジンからなる群から選択される塩基性アミノ酸への置換、および  
386番のアミノ酸残基の、リジン、アルギニン、およびヒスチジンからなる群から選択される塩基性アミノ酸への置換  
である、請求項5に記載の変異体。
- [7] 165番、300番および313番のアミノ酸残基において変異を有する、請求項4～6のいずれか一項に記載の変異体。
- [8] 変異が置換である、請求項7に記載の変異体。
- [9] 置換が、  
165番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、およびチロシンからなる群から選択される芳香族アミノ酸への置換、  
300番のアミノ酸残基の、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンおよびバリンからなる群から選択されるアミノ酸への置換、  
313番のアミノ酸残基の、リジン、アルギニン、およびヒスチジンからなる群から選択される塩基性アミノ酸への置換  
である、請求項8に記載の変異体。
- [10] 下記アミノ酸配列からなる、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体：  
(c) 40番、379番、および381番のアミノ酸残基において少なくとも1つの変異を有する、配列番号2に記載のアミノ酸配列；または  
(d) 配列番号2の40番、379番、および381番のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基において少なくとも1つの変異を有する、配列番号2に記載のアミノ酸配列の相同体。
- [11] 変異が、置換である、請求項10に記載の変異体。

[12] 置換が、

40番のアミノ酸残基の、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択される酸性アミノ酸への置換、

379番のアミノ酸残基の、システインへの置換、および

381番のアミノ酸残基の、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸への置換

である、請求項11に記載の変異体。

[13] 請求項1～12のいずれか一項に記載の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体をコードする、ポリヌクレオチド。

[14] 請求項13に記載のポリヌクレオチドを含んでなる、組換えベクター。

[15] 請求項14に記載の組換えベクターを含んでなる、形質転換体。

[16] 請求項15に記載の形質転換体または請求項1～12のいずれか一項に記載の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体とスクロースを接触させる工程を含んでなる、フラクトオリゴ糖の製造法。

[図1]

SYHLDTTAPP PTNLSTLPNN TLFHVWRPRA HILPAEGQIG DPCAHYTDPS TGLFHVGFLH  
 TYPSIDYNSA PPNLSTLANN SLFETWRPRA HVLPPQNQIG DPCMHYTDPE TGIFHVGWLY  
 FHTPIDYNSA PPNLSTLANA SLFKTWRPRA HLLPPSGNIG DPCGHYTDPK TGLFHVGWLY  
  
 62 120  
 DGDGIAGATT ANLATYTDTS DNGSFLIQPG GKNDPVAVFD GAVIPVGVNN TPTLLYTSVS  
 NGNGASGATT EDLVTYQDLN PDGAQMILPG GVNDPIAVFD GAVIPSGIDG KPTMMYTSVS  
 SG--ISGATT DDLVTYKDLN PDGAPSIVAG GKNDPLSVFD GSVIPSGIDG MPTLLYTSVS  
  
 122 128 165 170 180  
 FLPIHWSTPY TRGSETQSLA VARDGGRRFD KLDQGPVIAD HPFAVDTA[ ] RDPFVFRSAK  
 YMPISWATAY TRGSETHSLA VSSDGGKNFT KLVQGPVI[ ] PPFGANVT[ ] RDPFLFQNPO  
 YLPIHWSTPY TRGSETQSLA VSYDGHHNFT KLNQGPVIPT PPFA[ ]NVTA[ ] RDYPVFQSPI  
  
 221 240  
 LDVLLSLDEE VARNETAVQQ AVDGWTEKNA PWYVAVSGGV HGVGPAQFLY RQNGGNASEF  
 FDSLLE----- SENG TWYTVI[ ]GGI HGDGPSAFLY RQHD---PDF  
 LDKSVN----- STQG TWYVAISGGV HGVGPCQFLY RQND---ADF  
  
 300  
 QYWEYLGEWW QEATNSSWGD EGTWAGRWF NFETGNVLFL TEEGHDPQTG EVFVTLGTEG  
 QYWEYLGWPW NEEGNSTWGS -GDWAGRWFY NFEVINIVGL DDDGYNP-DG EIFATVGTEW  
 QYWEYLGQWW KEPLNTTWGK -GDWAGGWGF NFEVGNVFSL NAEGYSE-DG EIFITLGAEQ  
  
 313 360  
 SGLPIVPQVS S[ ]HDM[ ]LWAAG EVVGSEQEG AKVEFSPSMA GFLDWGFSAY AAAGKVL[ ]  
 SFDPIKPQAS DNREMLWAAG NM[ ]L-----ED GDIKFTPSMA GYLDWGLSAY AAAGKELPAS  
 SGLPIVPQVS S[ ]RDM[ ]LWTG NVTN-----D GS[ ]TFKPTMA GVLDWGV[ ]SAY AAAGKILPAS

[図2]

379 381 386 395 400  
SAVSKTSGVE VDRYVSF<sub>WL</sub> TGDQYEQADG FPTAQOOGWTG SLLLPRELK<sub>V</sub> QTVENVVDNE  
SKPS-QKSGA PDRFVSYL<sub>WL</sub> TGDYFEGHD- FPTPQQNWTG SLLLPRELSV GTIPNVVDNE  
SQAS-TKSGA PDRFISY<sub>WL</sub> TGDLFEQVK<sub>G</sub> FPTAQOQNWTG ALLLPREINV RTISNVVDNE

480  
LVREEGVSWV VGESDNQTAR LRTLGITIAR ETKAALLANG SVIAEEDRTL QTAAVVPFAQ  
LARETG-SWR VGTNDTGVL<sub>E</sub> LVTLKQE<sub>I</sub>AR ETLAEMTSGN SFT-EASRNV SSPGSTAFQQ  
LSRESLTSWR VAREDSGQID LETMGISISR ETYSALTSGS SFV-ESGKTL SNAGAVPFNT

540  
SPSSKFFVLT AQLEFPASAR SSPLQSGFEI LASELERTAI YYQFSNESLV VDRSQT<sub>SAAA</sub>  
SLDSKFFVLT ASLSFPSSAR DSDLKAGFEI LSSEFESTTV YYQFSNESII IDR<sub>SNSAAA</sub>  
SPSSKFFVLT ANISFPTSAR DSGIQAGFQV LSSSLESTTI YYQFSNESII VDRSNT<sub>SAAA</sub>

550 600  
PTNPGLDS<sub>FT</sub> ESGKLRLFDV IENGQE<sub>QVET</sub> LDLTVVVDNA VVEVYANGRF ALSTWARS<sub>WY</sub>  
LTTDGIDTRN EFGKMRLFDV VEGDQERIET LDLTIVVDNS IVEVHANGRF ALSTWVR<sub>RSWY</sub>  
RTTAGILSDN EAGRLRLFDV LRNGKE<sub>QVET</sub> LE<sub>L</sub>LTIVVDNS VLEVYANGRF ALGTWARS<sub>WY</sub>

DNSTQIRFFH NGEGEVQFRN VSVSEG<sub>LYNA</sub> WPERN\*  
ESSKD<sub>DI</sub>KFFH DGDSTVQFSN ITVYEGLFDA WPERAR\*  
ANSTKINFFH NGVGEATFED VTVFEG<sub>LYDA</sub> WPQRK\*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003787

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/56, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, 9/42, C12P19/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/56, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, 9/42, C12P19/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIIDS (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq,  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/34004 A1 (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 18 September, 1997 (18.09.97), & EP 889134 A1 & US 2002/0192771 A1	1-16
A	WO 99/13059 A1 (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 18 March, 1999 (18.03.99), & EP 1022332 A1 & US 6566111 B1	1-16
P, A	JP 2004-242528 A (Dokuritsu Gyosei Hojin Nogyo Seibusu-kei Tokutei Sangyo Gijutsu Kenkyu Kiko), 02 September, 2004 (02.09.04), (Family: none)	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
11 April, 2005 (11.04.05)

Date of mailing of the international search report  
26 April, 2005 (26.04.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2005/003787

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The matter common to claims 1 to 9 and 10 to 12 resides in a  $\beta$ -fructofuranosidase mutant having a mutation in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2.

As the results of the search, however, it is clarified that such a  $\beta$ -fructofuranosidase mutant having a mutation in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 is not novel because of having been disclosed in documents "WO 97/34004 A1 (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 18 September, 1997 (18.09.97) & EP 889134 A1 & US 2002/0192771 A1".

Therefore, this common matter falls within the category of the prior art and cannot be regarded as a special technical (continued to extra sheet)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2005/003787

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

feature in the meaning within PCT Rule 13.2.

Such being the case, there is no special technical matter common to all claims and the above-described invention groups cannot be considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））  
Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/56, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, 9/42, C12P19/14

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））  
Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/56, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, 9/42, C12P19/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIIDS(STN), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 97/34004 A1 (明治製菓株式会社) 1997.09.18 & EP 889134 A1 & US 2002/0192771 A1	1-16
A	WO 99/13059 A1 (明治製菓株式会社) 1999.03.18 & EP 1022332 A1 & US 6566111 B1	1-16
P A	JP 2004-242528 A (独立行政法人農業・生物系特定産業技術 研究機構) 2004.09.02 (ファミリーなし)	1-16

□ C欄の続きにも文献が列挙されている。

□ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.04.2005

国際調査報告の発送日

26.4.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

田中 晴絵

4N 3335

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲\_\_\_\_\_は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求の範囲\_\_\_\_\_は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲\_\_\_\_\_は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-9、10-12に共通の事項は、配列番号2に記載のアミノ酸配列に変異を有する $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体である。

しかしながら、調査の結果、配列番号2に記載のアミノ酸配列に変異を有する $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ変異体は、文献「WO 97/34004 A1 (明治製菓株式会社) 1997.09.18 & EP 889134 A1 & US 2002/0192771 A1」に開示されているから、新規でないことが明らかとなった。

よって、この共通事項は先行技術の域を出るものではないから、PCT規則13.2における特別な技術事項であるとはいえない。

それ故に、請求の範囲の全てに共通の特別な技術事項ではなく、上記発明群が单一の一般的な発明概念を形成するように関連している一群の発明であるとは認められない。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。